



ARTIGO

Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae)

Monique Cristine Rodrigues Abrão¹, Jackeline Jorge¹, Rosete Pescador²,
Wagner de Melo Ferreira³ e Rogério Mamoru Suzuki^{1*}

Recebido: 17 de dezembro de 2013

Recebido após revisão: 15 de julho de 2014

Aceito: 23 de julho de 2014

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2838>

RESUMO: (Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae)). A família Orchidaceae está entre as mais ameaçadas do mundo e *Cattleya loddigesii* Lindl. encontra-se em franco declínio nas florestas do estado de São Paulo. O presente trabalho analisou a influência de diferentes meios de cultura na germinação e no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii*. Foram utilizados os meios Knudson C (KC), Vacin & Went (VW), Murashige & Skoog (MS), e o meio MS com metade da concentração de nutrientes (MS/2), todos suplementados com 2% de sacarose e micronutrientes do meio MS. Foram avaliados a percentagem de sementes viáveis, por meio do teste de tetrazólio, a percentagem de sementes germinadas, o desenvolvimento inicial e o crescimento de plantas após 180 e 360 dias. A análise da viabilidade mostrou que aproximadamente 68% das sementes estavam viáveis. Vinte dias após os primeiros indícios da germinação, o meio MS proporcionou a maior percentagem de germinação (77%). No desenvolvimento inicial, verificou-se após 180 dias de cultivo *in vitro* que os meios VW e KC proporcionaram maior quantidade de plântulas com folhas e ao menos uma raiz (93 e 91%, respectivamente), porém muitas plântulas morreram. A análise de desenvolvimento aos 540 dias mostrou que as plantas cultivadas nos meios MS e MS/2 apresentaram maiores massas de matéria fresca e seca da porção caulinar e mais folhas, portanto gerando plantas mais vigorosas. Deste modo, verificou-se promoção diferencial dos meios de cultura em fases distintas do desenvolvimento de *C. loddigesii*.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, meios de cultura, orquídea.

ABSTRACT: (*In vitro* seed germination and seedling development of *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae)). The orchid family is among the world's most endangered and *Cattleya loddigesii* Lindl. is in decline in the forests of the State of São Paulo. This study examined the influence of different culture media on germination and *in vitro* development of *Cattleya loddigesii*. Knudson C (KC), Vacin & Went (VW), Murashige and Skoog (MS), and MS media with half the concentration of nutrients (MS/2) were tested and compositions were supplemented with 2% sucrose and MS micronutrients. The percentage of viable seeds by tetrazolium test, the percentage of germinated seeds, the initial development and growth of plants after 180 and 360 days were the parameters evaluated. The viability test showed that approximately 68% of seeds were viable. Twenty days after the first signs of germination, the MS media yielded the highest germination percentage (77%). In the early development, after 180 days of *in vitro* culture the KC and VW media resulted in the largest number of seedlings with at least one leaf and root (93 and 91%, respectively), although many seedlings have died. At 540 days, the development analysis showed that plants in MS and MS/2 media presented higher fresh and dry masses of stem and highest number of leaves as well, producing more vigorous plants. Therefore, there was differential promotion of culture media at different stages of development *C. loddigesii*.

Key words: *In vitro* culture, culture media, orchid.

INTRODUÇÃO

As orquídeas compreendem uma das famílias vegetais mais diversas do mundo, sendo a família Orchidaceae composta por aproximadamente 800 gêneros e 24.500 espécies (Chase *et al.* 2003, Dressler 2005). Além disso, em meados de agosto de 2012 atingiu 152.600 híbridos cultivados (RHS 2012).

Sua ampla distribuição e capacidade de ocupar diversos tipos de ambientes são decorrentes das adaptações para sobrevivência, como por exemplo, o desenvolvimento de pseudobulbos, a presença de folhas carnosas e raízes com velame (Pinheiro *et al.* 2004).

Cattleya loddigesii Lindl. é uma espécie epífita encon-

trada no Sudeste do Brasil, em altitudes de 600 a 900 m. Apresenta folhas elípticas de até 16 cm de comprimento, pseudobulbos cilíndricos, sendo que cada inflorescência pode suportar até oito flores, que exalam um distinto perfume ao entardecer (Braem 1984). As flores possuem coloração que varia da tonalidade lavanda claro ao escuro, coerulea ou branca, podendo apresentar pequenas manchas escuras, de formato circular e um halo branco em seu labelo, gerando grande atrativo comercial.

Atualmente, *C. loddigesii* encontra-se em declínio populacional nas florestas do estado de São Paulo. Assim como outras espécies de orquídeas, está ameaçada de extinção devido à devastação de seu habitat e pelo fato

1. Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa, Orquidário do Estado. Avenida Miguel Stéfano 3687, CEP 04301-902, São Paulo, SP, Brasil.
2. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia. Rodovia Admar Gonzaga, Km 3, Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

3. Universidade Federal de Tocantins, Núcleo de Estudos Ambientais (NEAMB). Caixa Postal 111, CEP 77500-000, Porto Nacional, TO, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: rogeriomsuzuki@yahoo.com.br

de possuir um ciclo de vida complexo que necessita da associação com fungos micorrízicos para germinação de suas sementes na natureza. Além disso, apresenta crescimento lento e um longo período vegetativo até atingir a maturidade reprodutiva. Desta forma, o cultivo *in vitro* representa uma ferramenta eficaz contra a extinção (Arditti 1967).

A germinação de sementes de orquídeas *in vitro* vem sendo realizada desde o início do século passado, quando Knudson (1922) descreveu a germinação das mesmas em meio de cultura assimbiótico, ou seja, na ausência de fungos simbiotes. Neste processo, sementes são induzidas a germinar em recipientes de vidro contendo meio de cultura, mantidas em condições assépticas, em sala de crescimento onde fatores ambientais como luz e temperatura são adequadamente controlados (Suzuki & Ferreira 2007). As técnicas de cultivo *in vitro* tornaram-se bastante úteis no sentido de multiplicar as plantas mais rapidamente. É uma ferramenta importante para a conservação de espécies vegetais, permitindo obter um grande número de plantas em um tempo relativamente curto e com alta qualidade fitossanitária, contribuindo para a redução do risco de extinção (Arditti & Ernst 1992). A dificuldade apresentada pelo cultivo *in vitro*, sem a associação simbiótica com fungos, está nas diferentes necessidades nutricionais de cada espécie, sendo fundamental verificar nos meios de cultivo clássicos aqueles que atendem adequadamente os requerimentos para cada espécie de orquídea.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de quatro diferentes meios de cultura na germinação de sementes e no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de cultivo *in vitro* do Núcleo de Pesquisa - Orquidário do Estado. Foram utilizadas plantas de *Cattleya loddigesii* (Fig. 1) selecionadas previamente para polinização cruzada, pertencentes à coleção científica “Frederico Carlos Hoehne” do referido Núcleo do Instituto de Botânica. As sementes foram obtidas de quatro diferentes frutos maduros, oito meses após a polinização das flores, para realizar a germinação *in vitro* e estudos posteriores sobre o desenvolvimento das plântulas.

A análise da viabilidade das sementes foi efetuada por meio do teste de tetrazólio, no qual sementes foram imersas em 1 mL solução aquosa de 0,5% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio durante 24 h, no escuro, sob temperatura de 30 °C. Após esse período, foram preparadas três lâminas quadriculadas para análise em estereomicroscópio e a percentagem de viabilidade foi determinada, sendo consideradas viáveis aquelas sementes que apresentaram seu embrião corado em vermelho.

As sementes retiradas dos frutos passaram por um processo de desinfestação de acordo com Suzuki *et al.* (2009), sendo embebidas em água deionizada esterilizada



Figura 1. Aspecto geral da flor de *Cattleya loddigesii* Lidley. Barra: 2 cm.

por 30 min e transferidas para solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial 15% (v/v; 2% de cloro ativo) durante 10 min. Posteriormente, as sementes lavadas em água deionizada esterilizada, para realizar a semeadura nos meios de cultura.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram semeadas em quatro meios de cultura: meio VW (Vacin & Went 1949), modificado pela substituição do $\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$ pelo Fe-EDTA; meio MS (Murashige & Skoog 1962); meio MS com metade da concentração de macro e micronutrientes (MS/2) e meio KC (Knudson 1946), todos suplementados com 2% de sacarose e micronutrientes do meio MS, e geleificados com 4 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico. Ao meio KC, foi acrescentado sulfato de manganês, devido à menor concentração deste em relação ao meio MS (Tab. 1). O pH dos meios foi corrigido para 5,8±0,05 antes da adição do ágar. Após homogeneização em temperatura de ebulição (±100 °C), 40 mL de cada meio foram distribuídos em frascos de 200 mL, sendo a esterilização realizada em autoclave a 120 °C e 1,3 atm durante 15 min.

Foram realizadas quatro repetições para cada meio de cultura, para cada um dos quatro frutos utilizados; os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de cultura com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, com lâmpadas fluorescentes que fornecem 30 μmol.m⁻².s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa.

Decorridos 30 dias da semeadura, quatro amostras foram retiradas de cada meio, sendo duas de cada frasco, para a análise da percentagem de germinação. A análise foi realizada em lâminas quadriculadas e observadas sob estereomicroscópio, sendo consideradas germinadas as sementes em estágio de protocormo que apresentaram embrião intumescido e clorofilado (Fig. 2A).

Aos 90, 120 e 180 dias após a inoculação das sementes foram realizadas análises de desenvolvimento inicial, levando em consideração os parâmetros de crescimento mostrados na Figura 2B-E. Para tanto, foram retiradas

Tabela 1. Composição dos nutrientes (em mmol.L⁻¹) dos meios de cultura utilizados para a germinação e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya loddigesii*.

Nutrientes	KC (Knudson 1946)	MS (Murashige & Skoog 1962)	VW (Vacin & Went 1949)
Amônia (NH ₄ ⁺)	7,57	20,62	7,57
Nitrato (NO ₃ ⁻)	8,47	39,43	5,20
Fosfato (PO ₄ ⁻³)	1,84	1,25	3,13
Potássio (K)	1,84	20,06	6,97
Sulfato (SO ₄ ⁻³)	4,84	1,50	4,90
Cálcio (Ca ⁺²)	4,24	3,01	1,93
Magnésio (Mg ⁺²)	1,02	1,50	1,02
Cloro (Cl ⁻)	-	6,03	-
Nitrogênio total	16,04	60,06	12,77
Relação NH ₄ ⁺ :NO ₃ ⁻	0,89	0,52	1,46

quatro amostras aleatórias de cada um dos frascos dos meios de cultura. A avaliação de crescimento inicial foi realizada também aos 120 e 180 dias.

Após 180 dias de cultivo as plantas foram transferidas, para frascos de cultura de 400 mL contendo 80 mL de

meio para cada tratamento (os meios VW, MS, MS/2 e KC), e mantidas nas mesmas condições ambientais utilizadas para a germinação das sementes. Foram utilizados sete frascos (repetições), contendo 15 plântulas para cada tratamento. Ao final de 360 dias de cultivo, 18 plantas de cada tratamento foram retiradas aleatoriamente e analisadas em relação ao número de folhas e raízes formadas, quanto ao comprimento caulinar, comprimento da maior raiz, além das massas de matéria fresca e seca de caule e raiz, separadamente. A massa de matéria seca foi mensurada após os caules e raízes terem sido mantidos em estufa a 60 °C, até a obtenção de massa constante.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA- germinação/MANOVA- desenvolvimento e análises biométricas). Quando houve diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de viabilidade, verificada pelo teste de tetrazólio, mostrou que 68 ± 4% das sementes estavam viáveis. Outras orquídeas epífitas desse mesmo gênero

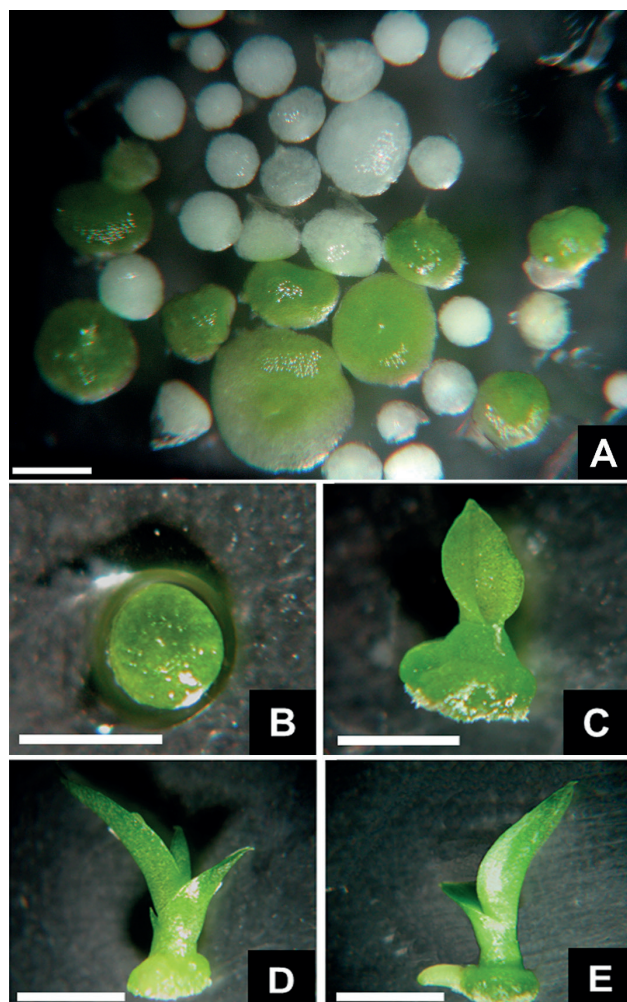


Figura 2. Sementes germinadas e estágios de desenvolvimento inicial de plântulas de *Cattleya loddigesii*. A. Sementes germinadas apresentam-se clorofiladas, sementes que não germinaram apresentam coloração branca ou marrom. B. Protocormo (Estágio I). C. Protocormo com a formação da primeira folha (Estágio II). D. Protocormo apresentando duas ou mais folhas (Estágio III). E. Plântula com folha e presença de raiz (Estágio IV). Barras: 10 mm.

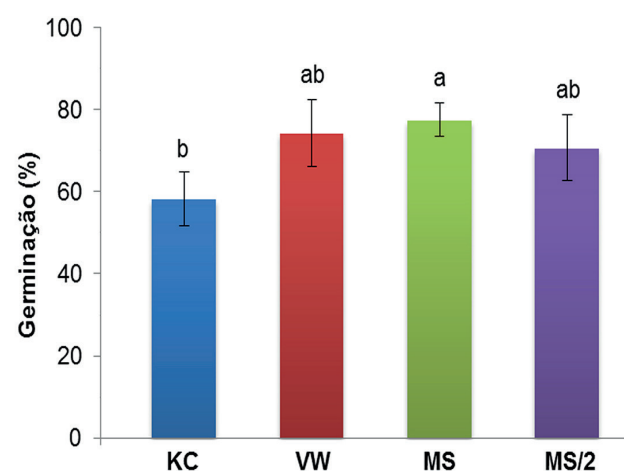


Figura 3. Percentagem de germinação de *Cattleya loddigesii* nos diferentes meios de cultura. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=3).

apresentaram viabilidade maior do que 80%, como em *C. intermedia* Graham ex Hook, com 99% (Alvarez-Pardo *et al.* 2006).

Trinta dias após a semeadura, foi possível observar os seguintes resultados em relação à percentagem de germinação: no meio MS a germinação foi de 78%; no meio VW, foi de 74%; no meio MS/2, 71% e apenas 58% no meio KC. Diferença significativa observada apenas entre os meios KC e MS (Fig. 3), diferentemente dos resultados

observados em *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & VP Castro (Suzuki *et al.* 2009), em que os meios basais MS e VW resultaram em menor percentagem de germinação, em relação ao meio KC. A maior percentagem de germinação obtida com os meios MS e MS/2 pode ser resultado da maior concentração de N total (60,06 e 30,03 mmol L⁻¹, respectivamente) em relação aos demais meios, além do maior teor de K (20,06 e 10,3 mmol L⁻¹, respectivamente).

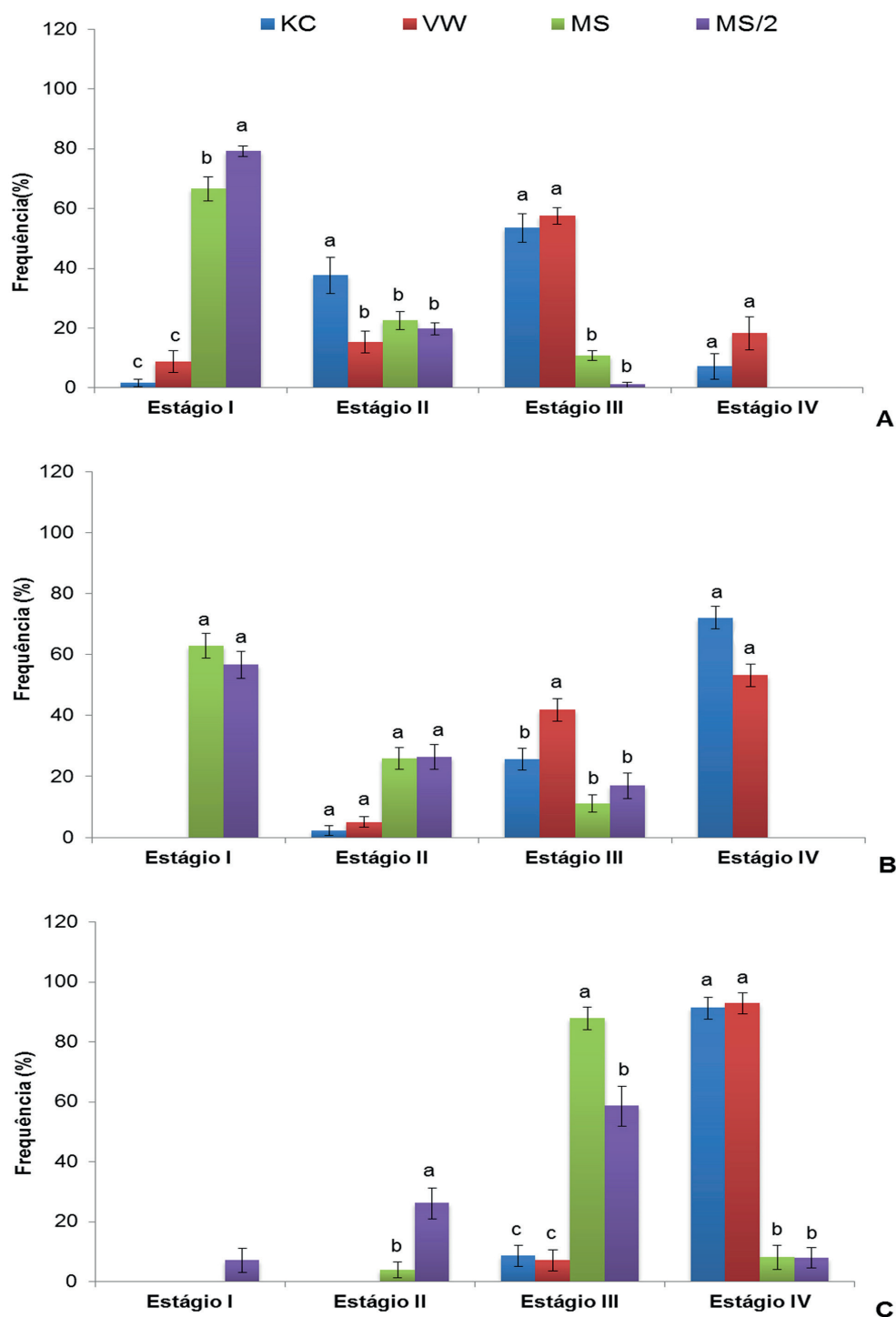


Figura 4. Efeitos de diferentes meios de cultura no desenvolvimento inicial de *Cattleya loddigesii*. A. 90 dias após a semeadura. B. 120 dias após a semeadura. C. 180 dias após a semeadura *in vitro*. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=40).

Após 90 dias, o maior desenvolvimento inicial foi observado nos meios VW e KC, apresentando 18 e 7%, respectivamente, de plântulas em estágio IV já se destacando pela presença de folhas e pelo menos uma raiz, e a maior percentagem de protocormos em estágio III (58%). Em relação às sementes inoculadas no meio MS/2, verificou-se desenvolvimento mais lento dos protocormos, uma vez que a maior parte permaneceu como protocormos no estágio I (79%), e plântulas no estágio IV não foram observadas (Fig. 4A).

Após 120 dias, os meios KC e VW promoveram o desenvolvimento mais rápido de *C. loddigesii*, pois 72 e 53%, respectivamente, apresentaram plântulas com folhas e raiz. Os meios de cultura menos favoráveis foram MS e MS/2 que promoveram a maior percentagem de protocormos no estágio I (63 e 56%, respectivamente) (Fig. 4B).

Decorridos 180 dias após a semeadura, os meios VW e KC foram os que promoveram melhor o desenvolvimento inicial das plântulas, apresentando 93 e 91% de plântulas no estágio IV, respectivamente. Apesar desses meios de cultura terem favorecido o desenvolvimento inicial, notou-se elevada percentagem de protocormos e plântulas mortas. Tais resultados podem ter sido decorrentes da

alta concentração de amônio, visando o balanço de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ dos meios KC e VW. Tanto o meio MS quanto MS/2 resultaram em baixa percentagem de plântulas no estágio IV de desenvolvimento (ambos 8%); a maior parte dos protocormos nestes dois meios de cultura encontrava-se no estágio III (88 e 59%, respectivamente) (Fig. 4C).

Os resultados obtidos no desenvolvimento inicial de *C. loddigesii* foram semelhantes aos apresentados por Suzuki *et al.* (2010), em *Cattleya bicolor* Lindley, quando o estímulo ao desenvolvimento inicial com os meios VW e KC foi relatado. Esses autores propuseram que tal resultado poderia decorrer da maior relação amônio/nitrato presente nesses meios, comparada ao meio MS (VW, KC e MS, respectivamente 1,45; 0,89 e 0,52). Além disso, a concentração de amônio nos meios foi adequada para a germinação das sementes até atingirem uma fase de desenvolvimento na qual poderiam assimilar o N na forma de nitrato, geralmente assimilada mais facilmente pelas plantas (George *et al.* 2008).

Araújo *et al.* (2009) mencionam que a razão entre o amônio e o N total deve ser de no máximo 0,33; a alteração dessas concentrações poderia ser prejudicial ao crescimento *in vitro* de orquídeas. O alto número de plântulas mortas causado em *C. loddigesii* poderia ser

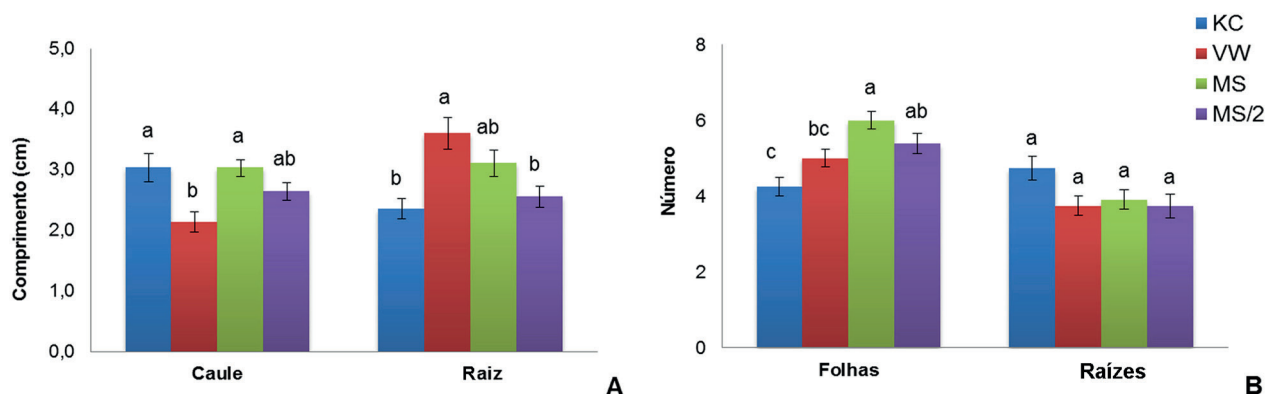


Figura 5. Efeitos de diferentes meios de cultura no comprimento de caule e da raiz maior (A) e no número de folhas e raízes (B) de *Cattleya loddigesii* após 360 dias de cultivo *in vitro*. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=12).

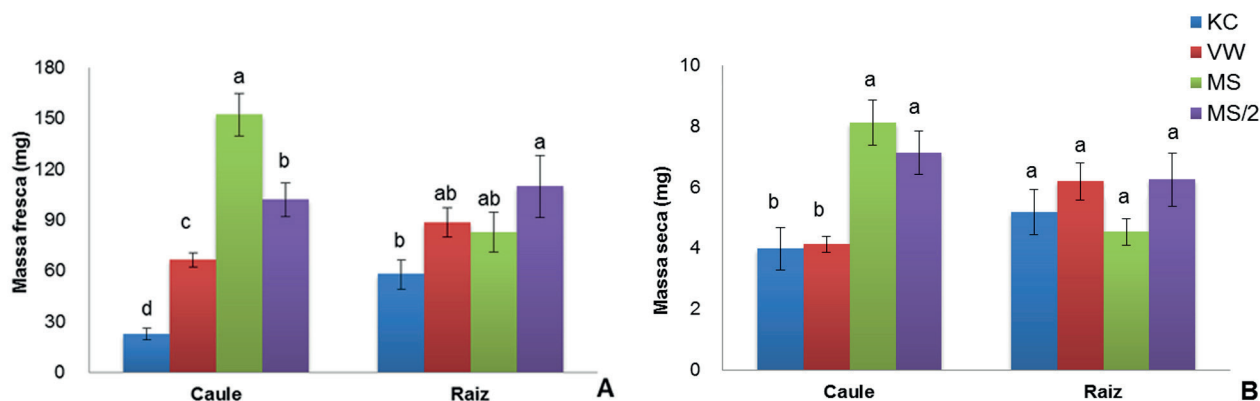


Figura 6. Efeitos de diferentes meios de cultura sobre o acúmulo de massa de matéria fresca (A) e de massa de matéria seca (B) de caules e raízes de *Cattleya loddigesii* após 360 dias de cultivo *in vitro*. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=12).

devido às altas concentrações de amônio presente nos meios VW e KC (0,59 e 0,47, respectivamente), em relação ao N total.

Na análise de desenvolvimento das plantas aos 360 dias, o comprimento caulinar das plantas crescidas nos meios KC, MS e MS/2 (3,0; 3,0 e 2,6 cm, respectivamente) mostraram diferenças significativas apenas quando comparadas ao meio VW (2,1 cm) (Fig. 6A). Diferentemente, em *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. os meios MS e MS/2 resultaram em maior comprimento caulinar quando comparados a KC e VW (Rego-Oliveira & Faria 2005).

O comprimento da raiz foi maior em VW (3,6 cm), diferentemente das raízes das plantas crescidas em KC (2,4 cm) e MS/2 (2,6 cm) (Fig. 5A). Tais resultados assemelharam-se aos apresentados por Suzuki *et al.* (2009), em que o meio VW favoreceu o crescimento radicular de *Hadrolaelia tenebrosa*, comparado a KC e MS. Tais resultados se opõem ao preceito de George *et al.* (2008) de que a relação amônio/nitrato deslocada para o amônio inibe o desenvolvimento das raízes. No meio VW, essa relação é de 1,46, e portanto inibiriam o desenvolvimento de raízes, pois a formação de raízes normalmente é estimulada pelo nitrato (Sattelmacher *et al.* 1993).

As plantas cultivadas no meio MS apresentaram maior número de folhas, do que aquelas crescidas no meio KC. Resultado semelhante foi relatado em plantas de *C. bicolor* (Suzuki *et al.* 2010). O número de raízes das plantas de *C. loddigesii* foi maior no meio KC, apesar de não apresentar diferença estatística (Fig. 5B).

As plantas cultivadas no meio MS apresentaram caules com maior massa fresca caulinar do que nos demais tratamentos. Por outro lado, maior massa fresca de raiz foi observada no meio MS/2 (110,0 mg) e a menor, em KC (58,2 mg) (Fig. 6A). A maior quantidade de massa de matéria fresca caulinar nas plantas cultivadas no meio MS poderia ser devido à concentração de K do meio, pois tal nutriente possui, entre outras funções, a regulação osmótica e o controle hídrico (Figueiredo *et al.* 2008). A influência do K no crescimento de *C. loddigesii* também foi observada por Figueiredo *et al.* (2008), em que a maior concentração deste nutriente (500 mg/L) no meio KC foi a que proporcionou melhor desenvolvimento de plântulas.

Quanto à massa de matéria seca dos caules, observou-se que os meios MS e MS/2 foram significativamente mais eficientes (8,1 e 7,1 mg, respectivamente), do que os meios VW (4,1 mg) e KC (4,0mg) (Fig. 6B). No entanto não houve efeito significativo dos meios de cultivo no acúmulo de massa de matéria seca nas raízes.

Contrário aos resultados aqui encontrados, plântulas de *Laelia longipes* Rchb.f. cultivadas nos meios KC, VW e MS apresentaram menor acúmulo de matéria seca de caule e de raiz no meio MS (Stancato *et al.* 2008).

Os resultados obtidos demonstram que a proporção de nutrientes presentes em cada meio de cultivo é de extrema importância em cada etapa do desenvolvimento da planta,

pois as sementes de *C. loddigesii* apresentaram maior germinação no meio MS e mais rápido desenvolvimento de plântulas nos meios KC e VW. No entanto, se a reprodução da espécie for com intuito de conservação, deve-se priorizar o uso do meio MS, que apesar de maior tempo de desenvolvimento, mantém um maior número de plantas viáveis. Os resultados confirmam assim a importância de avaliações durante diferentes fases de crescimento desta espécie e de outras espécies de orquídeas, para que se possa conhecer a reprodução e viabilizar de modo mais rápido e eficiente a conservação dessas espécies.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-PARDO, V., FERREIRA, A. & NUNES, V. 2006. Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura Brasileira*, 24: 217-220.
- ARAUJO, A. G., PASQUAL, M., RODRIGUES, F. A., CARVALHO, J. G. & ZARRAGA, D. Z. A. 2009. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 31: 35-39.
- ARDITTI, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33: 1-97.
- ARDITTI, J. & ERNST, R. 1992. *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley. 682 p.
- BRAEM, G.J. 1984. *The brazilian bifoliate Cattleyas*. Hildesheim: Brücke-Verlag. 94 p.
- CHASE, M. W., CAMERON, K. M., BARRETT, R. L. & FREUDENSTEIN, J. V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: DIXON, K. W., KELL, S.P., BARRETT, R.L. & CRIBB, P.J. (Eds.) *Orchid conservation*. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo). p. 69-89.
- DRESSLER, R.L. 2005. How many orchid species? *Selbyana*, 26: 155-158.
- FIGUEIREDO, M. A., PASQUAL, M., ARAUJO, A. G., JUNQUEIRA, K. P., SANTOS, F. C. & RODRIGUES, V. A. 2008. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. *Ciência Rural*, 38: 255-257.
- GEORGE, E. F., HALL, M. A. & KLERK, G.-J. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture: The Background (Vol.1)*. 3rd ed. Dordrecht: Springer. 508 p.
- KNUDSON, L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, 73: 1-25.
- KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-217.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- PINHEIRO, F., BARROS, F. & LOURENÇO, R. A. 2004. O que é uma Orquídea? In: BARROS, F. & KERBAUY, G. (Eds.). *Orquidologia Sul-Americana: uma compilação científica*. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente/Instituto de Botânica. p. 11-33.
- REGO-OLIVEIRA, L. & FARIA, R. 2005. *In vitro* propagation of brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum-Agronomy*, 27: 1-4.
- SATTELMACHER, B., GERENDAS, J. & THOMS, K. 1993. Interaction between root growth and mineral nutrition. *Environmental and Experimental Botany*, 33: 63-73.
- SOCIETY, R. H. 2012. Quarterly Supplement to the International Register and Checklist of Orchid Hybrids (Sander's List): April - June 2012 registrations. *The Orchids Review*, 120: 35-54.
- STANCATO, G. C., ABREU, M. F. & FURLANI, Â. M. C. 2008. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. *Bragantia*, 67: 51-57.

SUZUKI, R., ALMEIDA, V., PESCADOR, R. & FERREIRA, W. 2010. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). *Hoehnea*, 37: 731-742.

SUZUKI, R. M. & FERREIRA, W. M. 2007. Introdução às técnicas de micropropagação de orquídeas. In: BARBOSA, L.M. & SANTOS-JR, N.A. (Eds.). *A Botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais*. São Paulo: Imprensa Oficial. p. 655-659.

SUZUKI, R. M., MOREIRA, V. C., NAKABASHI, M. & FERREIRA, W. M. 2009. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & VP Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. *Hoehnea*, 36: 657-666.

VACIN, E.F. & WENT, F.W. 1949. Some pH Changes in Nutrient Solutions. *Botanical Gazette*, 110: 605-613.